

平成 23 年度アクリルアミド含有実態調査で使用した分析法及び妥当性確認の結果
(パン類)

(1) 分析方法

(ア) 試料の調製方法

1 製品の全量をフードミル等で粉砕・混合して均質化したものを分析用試料としました。

(イ) 分析手順

分析用試料 1.0 g に、10 µg/mL の内標準物質 (アクリルアミド 1,2,3-¹³C₃) 標準溶液 50 µL、水 15 mL、ヘキサン 20 mL と NH₂ パウダー 1.5 g を加え、10 分間激しく振とう後、遠心分離 (3,000 rpm、5 分間) しました。

マニホールドを用い、水層を、Sep-Pak[®] tC18 カートリッジと Sep-Pak[®] AC-2 カートリッジを連結したカラム (あらかじめ水 15 mL、メタノール 15 mL、水 15 mL で洗浄したもの) に負荷し、水 15 mL で洗浄し、1 分間乾燥しました。

メタノール 15 mL でアクリルアミドを溶出させ、溶出液を 0.5 mL 以下になるまで減圧濃縮 (40 ° C 以下) した後、超純粋で洗浄しながら 1 mL に定容し、試験溶液としました。

試験溶液 10 µL を高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) に供し、定量しました。LC-MS/MS の条件は、表 1 のとおりです。

表 1 アクリルアミド分析における LC-MS/MS の条件

機種	LC: ACQUITY UPLC system (Waters) MS/MS: 3200 Q Trap (Applied Biosystems)
HPLC カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 (Waters) 2.1 mm i.d. ×100 mm, 粒径 1.7 µm
カラム温度	55 °C
移動相	Solvent A: 5 mM 酢酸アンモニウム Solvent B: メタノール グラジエント 0 分 A/B (90/10) → 3 分 A/B (90/10) → 6 分 A/B (0/100) → 14 分 A/B (0/100)
流速	0.15 mL/分

MS/MS	イオン化法:ESI (ポジティブ) イオンスプレー電圧:5500V イオン源温度:300 °C カーテンガス : 20.00 コリジョンガス : 3.00 ネブライザーガス:70.00 psi ターボ(AUX)ガス:80.00 psi デクラスタリング電位:51 V(アクリルアミド)、46 V(内標準物質) コリジョンエネルギー:15 V(アクリルアミド、内標準物質) 27 V(アクリルアミド確認イオン) 25 V(内標準物質確認イオン)
設定質量数 (m/z)	アクリルアミド:72.1>55.0 (定量イオン) 72.1>44.1 (確認イオン) 内標準物質: 75.07>58.1 (測定イオン) 75.07>45.1 (確認イオン)

(2) 妥当性確認の結果

(ア) 検出限界及び定量限界

試料（カレーパン）にアクリルアミド標準液を、定量限界付近の濃度となるよう添加し、3回繰り返し測定をしたときの測定値の標準偏差から次式により算出しました。

検出限界=3×標準偏差

定量限界=10×標準偏差

表 2 検出限界及び定量限界

調査対象食品	検出限界 (mg/kg)	定量限界 (mg/kg)
カレーパン	0.005	0.01

(イ) 標準添加回収率

試料（食パン、カレーパン）に、表 3 に示した 2 濃度に相当する量のアクリルアミド標準液を添加し、それぞれの濃度で 3 回分析し、それぞれの濃度における回収率及び標準偏差(SDr)を算出しました。その結果、回収率が分析法の性能規準に関する国際的なガイドラインに示されている値を満たしていることを確認しました。

表 3 標準添加回収試験の結果

調査対象食品	添加濃度 (mg/kg)	回収率の範囲(%)	平均回収率(%)	回収率の標準 偏差(SDr)
食パン	0.010	93 - 101	96	4.5
	0.20	98 - 100	99	1.0
カレーパン	0.010	81 - 98	90	9.5
	0.20	89 - 99	94	5.3

(ウ) 測定の不確かさ

表4に示した2濃度に相当する量のアクリルアミド標準液を添加した試料(食パン、カレーパン)について、それぞれ7回の繰り返し試験を異なる3日間で実施し、室内再現精度(RSD_i)を算出しました。

その結果、RSD_iは、分析法の性能基準に関する国際的なガイドラインに示されている値を満たしていることを確認しました。

表 4 繰り返し試験から算出した室内再現精度 (RSD_i)

調査対象食品	添加濃度(mg/kg)	RSD _i (%)
食パン	0.030	4.7
	0.40	3.0
カレーパン	0.030	11.3
	0.40	2.6